

JP06277067A

MicroPatent Report**GENE DNA CODING ACETOHYDROXY ACID  
ISOMEROREDUCTASE**

[71] Applicant: MITSUBISHI  
PETROCHEM CO LTD

[72] Inventors: INUI MASAYUKI;  
KOBAYASHI MIKI;  
YUGAWA HIDEAKI

[21] Application No.: JP05068153

[22] Filed: 19930326

[43] Published: 19941004

[No drawing]

Go to Fulltext

[57] Abstract:

PURPOSE: To produce L-isoleucine or L-valine in high efficiency by using a gene originated from coryneform bacteria and coding acetohydroxy acid isomeroreductase.

CONSTITUTION: A gene coding acetohydroxy acid isomeroreductase and consisting of 1014 base pairs coding 338 amino acids is separated from Brevibacterium flavum MJ-233 and introduced into the same kind of coryneform bacteria. L- isoleucine or L- valine can be produced in high efficiency from a new viewpoint by using the transformed coryneform bacteria.

[51] Int'l Class: C12N01553 C12N00121 C12N00904 C12N01553  
C12R00113 C12N00121 C12R00113

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-277067

(43)公開日 平成6年(1994)10月4日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/53	Z N A			
1/21		7236-4B		
9/04	Z	9359-4B		
// (C 1 2 N 15/53		9050-4B	C 1 2 N 15/ 00	A
		審査請求 未請求	請求項の数 7	OL (全 13 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平5-68153

(22)出願日 平成5年(1993)3月26日

(71)出願人 000006057

三菱油化株式会社

東京都千代田区丸の内二丁目5番2号

(72)発明者 乾 将行

茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号

三菱油化株式会社筑波総合研究所内

(72)発明者 小林 幹

茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号

三菱油化株式会社筑波総合研究所内

(72)発明者 湯川 英明

茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号

三菱油化株式会社筑波総合研究所内

(74)代理人 弁理士 山本 隆也

(54)【発明の名称】 アセトヒドロキシ酸イソメロダクターゼをコードする遺伝子DNA

(57)【要約】 (修正有)

【目的】 コリネ型細菌由来のアセトヒドロキシ酸イソメロダクターゼをコードする遺伝子を用い、効率的にL-イソロイシン又はL-バリンを製造する。

【構成】 プレバクテリウム・フラバムMJ-233から単離された、338個のアミノ酸をコードする1014の塩基対より成るアセトヒドロキシ酸イソメロダクターゼをコードする遺伝子を単離し、該遺伝子を同種であるコリネ型細菌に導入し、該コリネ型細菌を用いて、新たな観点から効率的にL-イソロイシン又はL-バリンを製造する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 コリネ型細菌由来のアセヒドロキシ酸イソメロレダクターゼをコードする遺伝子DNA。

【請求項2】 コリネ型細菌がブレヴィバクテリウム・フ

ラバム (*Brevibacterium flavum* m) MJ-233である請求項1記載の遺伝子DNA。

【請求項3】 次のDNA塩基配列

```

ATGGCTATTG AACTGCTTTA TGATGCTGAC GCTGACCTCT CCTTGATCCA GGGCCGTAAG 60
GTTGCCATCG TTGGCTACGG CTCCCAGGGC CACGCACACT CCCAGAACCT CCGCGATTCT 120
GGCGTTGAGG TTGTCAATTG TCTGCGGAG GGCTCCAAGT CCGCAGAGAA GGCAAAGGAA 180
GCAGGCTTCG AAGTCAAGAC CACCGCTGAG GCTGCAGCTT GGGCTGACGT CATCATGCTC 240
CTGGCTCCAG ACACCTCCCA GGCAGAAATC TTCACCAACG ACATCGAGCC AAACCTGAAC 300
GCAGGCGACG CACTGCTGTT CGGCCACGGC CTGAACATTC ACTTCGACCT GATCAAGCCA 360
GCTGACGACA TCATCGTTGG CATGGTTGGG CCAAAGGGCC CAGGCCACTT GGTTGCGCGT 420
CAGTTGTTG ATGGCAAGGG TGTTCCTTGC CTCATCGCAG TCGACCAGGA CCCAACCGGA 480
ACCGCACAGG CTCTGACCCT GTCCTACGCA GCAGCAATCG GTGGCGCAGC CGCAGGCGTT 540
ATCCCAACCA CCTTCGAAGC TGAGAACGTC ACCGACCTCT TCGGCGAGCA GGCTGTTCTC 600
TGCGGTGGCA CCGAGGAACT GGTCAAGGTT GGCTTCGAGG TTCTCACCGA AGCTGGCTAC 660
GAGCCAGAGA TGGCATACTT CGAGGTTCTT CACGAGCTCA AGCTCATCGT TGACCTCATG 720
TTCGAAGGTG GCATCAGCAA CATGAACATC TCTGTTTCTG ACACCGCTGA GTTCGGTGGC 780
TACCTCTCCG GCCACGCGT CATCGATGCA GACACCAAGT CCGCATGAA GGACATCCTG 840
ACCGATATCC AGGACGGCAC CTCAACCAAG CGCTCATCG CAAACGTTGA GAACGGCAAC 900
ACCGAGCTTG AGGGTCTTCG TGCTTCCTAC AACCAACCACC CAATCGAGGA GACCGGCGCT 960
AAGCTCCGCG ACCTCATGAG CTGGGTCAAG GTTGACGCTC GGCAGAAAC CGCTTAA 1017

```

で表されるアセヒドロキシ酸イソメロレダクターゼをコードする遺伝子DNA。

【請求項4】 次のアミノ酸配列

```

Met Ala Ile Glu Leu Leu Tyr Asp Ala Asp Ala Asp Leu Ser Leu Ile
  1           5           10          15
Gln Gly Arg Lys Val Ala Ile Val Gly Tyr Gly Ser Gln Gly His Ala
  20          25          30
His Ser Gln Asn Leu Arg Asp Ser Gly Val Glu Val Val Ile Gly Leu
  35          40          45
Arg Glu Gly Ser Lys Ser Ala Glu Lys Ala Lys Glu Ala Gly Phe Glu
  50          55          60
Val Lys Thr Thr Ala Glu Ala Ala Ala Trp Ala Asp Val Ile Met Leu
  65          70          75          80
Leu Ala Pro Asp Thr Ser Gln Ala Glu Ile Phe Thr Asn Asp Ile Glu
  85          90          95
Pro Asn Leu Asn Ala Gly Asp Ala Leu Leu Phe Gly His Gly Leu Asn
 100         105         110
Ile His Phe Asp Leu Ile Lys Pro Ala Asp Asp Ile Ile Val Gly Met
 115         120         125
Val Ala Pro Lys Gly Pro Gly His Leu Val Arg Arg Gln Phe Val Asp
 130         135         140
Gly Lys Gly Val Pro Cys Leu Ile Ala Val Asp Gln Asp Pro Thr Gly
 145         150         155         160
Thr Ala Gln Ala Leu Thr Leu Ser Tyr Ala Ala Ala Ile Gly Gly Ala
 165         170         175
Arg Ala Gly Val Ile Pro Thr Thr Phe Glu Ala Glu Thr Val Thr Asp
 180         185         190
Leu Phe Gly Glu Gln Ala Val Leu Cys Gly Gly Thr Glu Glu Leu Val
 195         200         205
Lys Val Gly Phe Glu Val Leu Thr Glu Ala Gly Tyr Glu Pro Glu Met

```

210	215	220
Ala Tyr Phe Glu Val	Leu His Glu Leu Lys Leu Ile Val Asp Leu Met	
225	230	235
Phe Glu Gly Gly Ile Ser Asn Met Asn Tyr Ser Val Ser Asp Thr Ala		240
	245	250
Glu Phe Gly Gly Tyr Leu Ser Gly Pro Arg Val Ile Asp Ala Asp Thr		255
	260	265
Lys Ser Arg Met Lys Asp Ile Leu Thr Asp Ile Gln Asp Gly Thr Phe		270
	275	280
Thr Lys Arg Leu Ile Ala Asn Val Glu Asn Gly Asn Thr Glu Leu Glu		285
	290	295
Gly Leu Arg Ala Ser Tyr Asn Asn His Pro Ile Glu Glu Thr Gly Ala		300
305	310	315
Lys Leu Arg Asp Leu Met Ser Trp Val Lys Val Asp Ala Arg Ala Glu		320
	325	330
		335
Thr Ala		

で表されるアセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼをコードする遺伝子DNA。

【請求項5】 請求項1～4のいずれかに記載の遺伝子DNAが導入された組換えプラスミド。

【請求項6】 請求項1～4のいずれかに記載の遺伝子DNAと、コリネ型細菌内で複製増殖機能を司る遺伝子を含むDNAを保有する組換えプラスミド。

【請求項7】 請求項6記載の組換えプラスミドで形質転換されたコリネ型細菌。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、コリネ型細菌由来のアセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼ (E. C. 1. 1. 1. 86) をコードする遺伝子DNA、該遺伝子を含む組換えプラスミド、該プラスミドで形質転換されたコリネ型細菌に関する。

【0002】

【従来の技術】 アセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼ (E. C. 1. 1. 1. 86) は、イソロイシン及びバリンの生合成遺伝子の一つとして、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) においてよく研究されており [ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (Journal of Biological Chemistry) 261, 2441-2450, 1986]、その他にも、シネコシスティス (*Synechocystis* sp.) 由来遺伝子 [ジャーナル・オブ・バクテリオロジー (Journal of Bacteriology) 174, 7910-7918, 1992]、ラクトコッカス・ラクティス (*Lactococcus lactis*) 由来遺伝子 [ジャーナル・オブ・バクテリオロジー (Journal of Bacteriology) 174, 6580-6589, 1992]、リゾビウム・メリロティー (*Rhizobium meliloti*) 由来遺伝子 [ジ

ャーナル・オブ・バクテリオロジー (Journal of Bacteriology) 173, 7756-7764, 1991]、サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 由来遺伝子 [ヌクレック・アシッド・リサーチ (Nucleic Acid Research) 14, 9631-9651, 1986]、スピナチア・オレラセア (*Spinacia oleracea*) 由来遺伝子 [バイオケミカル・ジャーナル (Biochemical Journal) 277, 496-475, 1991] の一次構造が決定されている。。しかしながら、産業上重要な細菌であるコリネ型細菌由来のアセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼ (E. C. 1. 1. 1. 86) 遺伝子の一次構造について、従来の報告例はない。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の目的は、コリネ型細菌由来のアセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼ (E. C. 1. 1. 1. 86) をコードする遺伝子を単離し、該遺伝子を同種であるコリネ型細菌に導入し、該コリネ型細菌を用いて、新たな観点から効率的にL-イソロイシン又はL-バリンを製造することである。

【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、上記目的を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、コリネ型細菌染色体よりアセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼ遺伝子を単離することに成功し、本発明を完成するに至った。かくして、本発明によれば、(1) コリネ型細菌由来のアセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼをコードする遺伝子DNA、(2) 該遺伝子DNAが導入された組換えプラスミド、(3) 該組換えプラスミドで形質転換されたコリネ型細菌、が提供される。

【0005】 以下、本発明についてさらに詳細に説明する。本発明の「アセトヒドロキシ酸イソメロレダクター

ゼをコードする遺伝子DNA」とは2-アセト-2-ヒドロキシ酪酸から2, 3-ジヒドロキシ-3-メチル吉草酸を合成する酵素、あるいは、2-アセト乳酸から2, 3-ジヒドロキシイソ吉草酸を合成する酵素、すなわちアセトヒドロキシ酸イソメロダクターゼ (E. C. 1. 1. 86) をコードする遺伝子DNAを意味する。

【0006】アセトヒドロキシ酸イソメロダクターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片 (以下、これを「A断片」と略称することがある) は、その塩基配列が決定された後は合成することも可能であるが、一般にはアセトヒドロキシ酸イソメロダクターゼ生産性を有する微生物からクローニングすることができ、その供給源となる微生物としては、コリネ型細菌、殊にブレビバクテリウム・フラバム (*Brevibacterium flavum*) MJ-233 (FERM BP-1497) およびその由来株が有利に使用される。

【0007】これらの供給源微生物からA断片を調製するための基本的操作の一例を述べれば次のとおりである: A断片は、上記コリネ型細菌、例えばブレビバクテリウム・フラバムMJ-233 (FERM BP-1497) 株の染色体上に存在し、この染色体を適当な制限酵素で切断することにより生ずる切断断片の中から以下に述べる方法で分離、取得することができる。

【0008】まず、ブレビバクテリウム・フラバムMJ-233株の培養物から染色体DNAを抽出する。この染色体DNAを適当な制限酵素、例えばBgl II 及びEcoRIを用いて染色体DNAを完全に分解する。得られるDNA断片を平滑末端処理後、大腸菌における発現ベクター、例えばpKK233-3 (ファルマシア製) に挿入し、このベクターを用いてアセトヒドロキシ酸イソメロダクターゼ遺伝子が欠損したイソロイシン

及びバリン要求性大腸菌変異株エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) ME8315 [国立遺伝学研究所、遺伝実験生物保存研究センター; 〒411、静岡県三島市谷田1111番地] を形質転換し、選択培地に塗抹することにより、形質転換株を取得する。得られる形質転換株よりプラスミドDNAを抽出し、制限酵素で解析することにより挿入されたブレビバクテリウム・フラバムMJ-233株染色体由来のA断片を確認・取得することができる。

【0009】かくして得られるA断片をさらに適当な制限酵素を用いて切断し、得られるDNA断片を、大腸菌で複製可能なベクタープラスミドに挿入し、このベクタープラスミドを通常用いられる形質転換法、例えば、塩化カルシウム法、電気パルス法等による形質転換により前記イソロイシン及びバリン要求性大腸菌変異株に導入し、選択培地に塗抹する。

【0010】得られる形質転換体よりプラスミドDNAを抽出し、制限酵素で解析することにより、挿入されたブレビバクテリウム・フラバムMJ-233株染色体由来のA断片を確認・取得することができる。このようにして得られるA断片の一つは、上記ブレビバクテリウム・フラバムMJ-233株の染色体DNAを制限酵素EcoRIの完全分解により切り出し、さらにそれを制限酵素Bgl II で切断することによって得られる大きさが約2.1 kbのDNA断片を挙げることができる。

【0011】この約2.1 kbのアセトヒドロキシ酸イソメロダクターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片を、各種の制限酵素で切断したときの認識部位数及び切断断片の大きさを下記表1に示す。

【0012】

【表1】

表1

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ (kb)		
Pvu II	1	1.55	0.55	
Sa I	2	0.95	0.65	0.5
EcoRV	1	1.1	1.0	
Stu I	1	1.8	0.3	
Dra I	1	1.4	0.7	

【0013】なお、本明細書において、制限酵素による「認識部位数」は、DNA断片又はプラスミドを、制限酵素の存在下で完全分解し、それらの分解物をそれ自体既知の方法に従い1%アガロースゲル電気泳動および5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、分離可能な断片の数から決定した値を採用した。

【0014】また、「切断断片の大きさ」及びプラスミドの大きさは、アガロースゲル電気泳動を用いる場合には、エシェリヒア・コリのラムダファージ ( $\lambda$  phage) のDNAを制限酵素Hind IIIで切断して得られる分子量既知のDNA断片の同一アガロースゲル上で

の泳動距離で描かれる標準線に基づき、また、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いる場合には、エシェリヒア・コリのファイ・エックス174ファージ ( $\phi$ x174 phage) のDNAを制限酵素Hae IIIで切断して得られる分子量既知のDNA断片の同一ポリアクリルアミドゲル上での泳動距離で描かれる標準線に基づき、切断DNA断片又はプラスミドの各DNA断片の大きさを算出する。プラスミドの大きさは、切断断片それぞれの大きさを加算して求める。なお、各DNA断片の大きさの決定において、1 kb以上の断片の大きさについては、1%アガロースゲル電気泳動によって得られる



結果を採用し、約0.1 kbから1 kb未満の断片の大きさについては4%ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって得られる結果を採用した。

【0015】一方、上記したブレバクテリウム・フラバムMJ-233の染色体DNAを制限酵素EcoRI、BglIIによって切断することにより得られる大きさが約2.1 kbのDNA断片については、その塩基配列をプラスミドpUC118及び/またはpUC119（宝酒造製）を用いるジデオキシヌクレオチド終止法（dideoxy chain termination法、Sanger, F. et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, p5463, 1977）により決定することができる。このようにして決定した上記約2.1 kbのDNA断片の塩基配列のオープンリーディングフレームの存在から決定したアセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼをコードする遺伝子は、後記する配列表の配列番号：1に示す配列を有するものであり、338個のアミノ酸をコードする1014塩基対から構成されている。

【0016】上記した、後記配列表の配列番号：1に示す塩基配列を包含して成る本発明のアセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片は、天然のコリネ型細菌染色体DNAから分離されたもののみならず、通常用いられるDNA合成装置、例えばアプライド・バイオシステムズ社製394 DNA/RNAシンセサイザーを用いて合成されたものであってもよい。

【0017】また、前記の如くブレバクテリウム・フラバムMJ-233の染色体DNAから取得される本発明のDNA断片は、アセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼをコードする機能を実質的に損なうことがない限り、塩基配列の一部の塩基が他の塩基と置換されていてもよく又は削除されていてもよく、或いは新たに塩基が挿入されていてもよく、さらに塩基配列の一部が転位されているものであってもよく、これらの誘導体のいずれもが、本発明のアセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片に包含されるものである。

【0018】以上に詳述した大きさが約2.1 kbのDNA断片の制限酵素切断点地図を図1に示す。本発明のアセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片（A断片）は、適当なプラスミドベクター、例えば、コリネ型細菌内でプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子を少なくとも含むプラスミドベクターに導入することにより、コリネ型細菌内でアセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼの高発現可能な組換えプラスミドを得ることができる。

【0019】また、本発明のアセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼをコードする遺伝子を発現させるためのプロモーターは、コリネ型細菌が保有する該遺伝子自身

のプロモーターであることができるが、それに限られるものではなく、アセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼ遺伝子の転写を開始させるための原核生物由来の塩基配列であれば、いかなるプロモーターであってもよい。

【0020】本発明のA断片を導入することができる、コリネ型細菌内での複製増殖機能を司る遺伝子を少なくとも含むプラスミドベクターとしては、例えば、特開平3-210184号公報に記載のプラスミドpCRY30；特開平2-276575号公報に記載のプラスミドpCRY21、pCRY2KE、pCRY2KX、pCRY31、pCRY3KE及びpCRY3KX；特開平1-191686号公報に記載のプラスミドpCRY2及びpCRY3；特開昭58-67679号公報に記載のpAM330；特開昭58-77895号公報に記載のpHM1519；特開昭58-192900号公報に記載のpAJ655、pAJ611及びpAJ1844；特開昭57-134500号に記載のpCG1；特開昭58-35197号公報に記載のpCG2；特開昭57-183799号公報に記載のpCG4及びpCG11等を挙げることができる。

【0021】中でもコリネ型細菌の宿主ベクター系で用いられるプラスミドベクターとしては、コリネ型細菌内でプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子とコリネ型細菌内でプラスミドの安定化機能を司る遺伝子とをもつものが好ましく、例えばプラスミドpCRY30、pCRY21、pCRY2KE、pCRY2KE、pCRY2KX、pCRY31、pCRY3KE及びpCRY3KX等が好適に使用される。

【0022】上記プラスミドベクターpCRY30を調製する方法としては、ブレバクテリウム・スタチオニス（*Brevibacterium stationis*）IFO12144（FERM BP-2515）からプラスミドpBY503（このプラスミドの詳細については特開平1-95785号公報参照）DNAを抽出し、制限酵素XhoIで大きさが約4.0 kbのプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子を含むDNA断片（以下これを「複製領域」と言うことがある。）を切り出し、制限酵素EcoRIおよびKpnIで大きさが約2.1 kbのプラスミドの安定化機能を司る遺伝子を含むDNA断片（以下これを「安定化領域」と言うことがある。）を切り出す。これらの両断片をプラスミドpHSG298（宝酒造製）のEcoRI、KpnI部位及びSalI部位に組み込むことにより、プラスミドベクターpCRY30を調製することができる。

【0023】次に、上記プラスミドベクターへの本発明のA断片の導入は、例えば、プラスミドベクター中に1箇所だけ存在する制限酵素部位を該制限酵素で開裂し、そこに前記A断片および開裂したプラスミドベクターを必要に応じてS1ヌクレアーゼで処理して平滑末端とするか、または適当なアダプターDNAの存在下にDNA

リガーゼ処理で連結させることにより行うことができる。

【0024】プラスミドpCRY30への本発明のA断片の導入は、プラスミドpCRY30を制限酵素EcoRIで開裂させ、そこに前記アセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片

(A断片)をDNAリガーゼで連結させることにより行うことができる。このようにして造成されるプラスミドpCRY30に本発明の大きさが約2.1 kbのA断片を導入した組換えプラスミドを、本発明者らはプラスミドpCRY30-IRと命名した。プラスミドpCRY30-IRの作成方法の詳細については、後記実施例で説明する。

【0025】かくして造成されるアセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼをコードする遺伝子を含むコリネ型細菌内で複製増殖可能なプラスミドを、宿主微生物に導入して該微生物の培養物を用いてL-イソロイシン及びL-バリンを安定に効率よく生産することが可能となる。本発明によるプラスミドで形質転換しうる宿主微生物としては、コリネ型細菌、例えばブレビバクテリウム・フラバムMJ-233 (FERM BP-1497)、ブレビバクテリウム・フラバムMJ-233-A B-41 (FERM BP-1498)、ブレビバクテリウム・フラバムMJ-233-ABT-11 (FERM BP-1500)、ブレビバクテリウム・フラバムMJ-233-ABD-21 (FERM BP-1499)等が挙げられる。

【0026】なお、上記のFERM BP-1498の菌株は、FERM BP-1497の菌株を親株としてDL- $\alpha$ -アミノ酪酸耐性を積極的に付与されたエタノール酸化性微生物である(特公昭59-28398号公報第3~4欄参照)。また、FERM BP-1500の菌株は、FERM BP-1497の菌株を親株としたL- $\alpha$ -アミノ酪酸トランスアミナーゼ高活性変異株である(特開昭62-51998号公報参照)。さらに、FERM BP-1499の菌株はFERMBP-1497の菌株を親株としたD- $\alpha$ -アミノ酪酸デアミナーゼ高活性変異株である(特開昭61-177993号公報参照)。

【0027】これらの微生物の他に、ブレビバクテリウム・アンモニアゲネス (*Brevibacterium ammoniagenes*) ATCC6871、同ATCC13745、同ATCC13746;ブレビバクテリウム・デバリカタム (*Brevibacterium divaricatum*) ATCC14020;ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム (*Brevibacterium lactofermentum*) ATCC13869;コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC31831等を宿主微生物として用いる

こともできる。

【0028】なお、宿主としてブレビバクテリウム・フラバムMJ-233由来の菌株を用いる場合、本菌株が保有するプラスミドpBY502(特開昭63-36787号公報参照)のため、形質転換が困難である場合があるので、そのような場合には、本菌株よりプラスミドpBY502を除去することが望ましい。そのようなプラスミドpBY502を除去する方法としては、例えば、継代培養を繰り返すことにより自然に欠失させることも可能であるし、人為的に除去することも可能である[Bact. Rev., 36, p. 361~405 (1972) 参照]。上記プラスミドpBY502を人為的に除去する方法の一例を示せば次のとおりである。

【0029】宿主ブレビバクテリウム・フラバムMJ-233の生育を不完全に阻害する濃度のアクリジンオレンジ(濃度:0.2~50 $\mu$ g/ml)もしくはエチジウムブロミド(濃度:0.2~50 $\mu$ g/ml)等を含む培地に、1ml当り約10細胞になるように植菌し、生育を不完全に阻害しながら、約24時間約35℃で培養する。培養液を希釈後寒天培地に塗布し、約35℃で約2日培養する。出現したコロニーから各々独立にプラスミド抽出操作を行い、プラスミドpBY502が除去されている株を選択する。この操作によりプラスミドpBY502が除去されたブレビバクテリウム・フラバムMJ-233由来菌株が得られる。

【0030】上記宿主微生物の前記組換えプラスミドによる形質転換は、それ自体既知の方法、例えばCalvin, N. M. and Hanawalt, P. C., Journal of Bacteriology, 170, 2796 (1988); Ito, K., Nishida, T. and Izaki, K., Agricultural and Biological Chemistry, 52, 293 (1988)等の文献に記載の方法により、例えば宿主微生物にパルス波を通電[Sato, Y. et al., Journal of Industrial Microbiology, 5, 159 (1990) 参照]することにより行うことができる。

【0031】上記の方法で形質転換して得られるアセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼ産生能を有するコリネ型細菌、例えばブレビバクテリウム・フラバムMJ-233由来株の培養方法を以下に述べる。培養は炭素源、窒素源、無機塩等を含む通常の栄養培地で行うことができ、炭素源としては、例えばグルコース、エタノール、メタノール、蔗糖等が、そして窒素源としては、例えばアンモニア、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウム、尿素等がそれぞれ単独もしくは混合して用いられる。また、無機塩としては、例えばリン酸一水素カリウム、リン酸二水素カリウム、硫酸マグネシウム等が用いられる。この他にペプトン、肉エキ

ス、酵母エキス、コーンステープリカー、カザミノ酸、ビオチン等の各種ビタミン等の栄養源を培地に添加することができる。

【0032】培養は、通常、通気攪拌、振盪等の好気条件下に、約20～約40℃、好ましくは約25℃～約35℃の温度で行うことができる。培養途中のpHは5～10、好ましくは7～8付近とすることができ、培養中のpH調整は酸又はアルカリを添加して行うことができる。培養開始時の炭素源濃度は、好ましくは1～5容量%、更に好ましくは2～3容量%である。また、培養期間は通常1～7日間とすることができ、最高期間は3日間である。

【0033】このようにして得られる培養物から各々菌体を集めて、水又は適当な緩衝液で洗浄し、L-イソロイシン又はL-バリン生成反応に使用することができる。L-イソロイシン又はL-バリン生成反応においては、これらの菌体をそのまま用いることができ、あるいは超音波処理等を加えた菌体破砕物又はそれから分離された粗酵素もしくは精製酵素として、あるいは適当な担体に固定化して用いることができる。以上に述べた如き菌体の破砕物、粗もしくは精製酵素、固定化物等を本明細書ではまとめて「菌体処理物」という。

【0034】しかして本発明に従えば、上記培養菌体又は菌体処理物の存在下に、少なくとも炭素源と窒素源を含有する水性反応液中にて酵素反応させてL-イソロイシン又はL-バリンを生成せしめることを特徴とするL-イソロイシン又はL-バリンの製造法が提供される。上記の酵素反応は、通常約20～約40℃、好ましくは約25～約35℃の範囲内で行うことができる。

【0035】水性反応液中に添加することができる炭素源、窒素源は、前記した通常の栄養培地に用いられるものを挙げることができる。また該水性反応液には、前記した通常の栄養培地に用いることができる無機塩等を添加することもできる。特に、本発明のプラスミドで形質転換しうる宿主微生物がビオチン要求性のコリネ型細菌である場合は、上記の如く調製された培養菌体またはその固定化物と、少なくとも炭素源と窒素源とを含有しかつビオチンを含有しない水性反応液中で、酵素反応させてL-イソロイシン又はL-バリンを生成せしめるのが好適である。この場合、ビオチン要求性のコリネ型細菌はビオチンを実質的に含有しない水性反応液中では菌体増殖せずに、該菌体の保有する代謝系において炭素源及び窒素源がエネルギー共役を伴う酵素反応を介して反応せしめられ、L-イソロイシン又はL-バリンが製造される。

【0036】しかして本発明に従えば、(1)上記培養菌体又はその固定化物の存在下に、少なくともエタノールと酪酸誘導体をビオチンを含有しない水性反応液中にて酵素反応させてL-イソロイシンを生成せしめることを特徴とするL-イソロイシンの製造法、(2)上記培養

菌体又はその固定化物の存在下に、少なくともグルコースを含有する水性反応液中にて酵素反応させてL-バリンを生成せしめることを特徴とするL-バリンの製造法が提供される。

【0037】上記した、本発明に従う水性反応液は、ビオチンを実質的に含有しない水あるいはリン酸またはトリス塩酸等の緩衝液であることもできるが、好ましくはビオチンを含有しない合成培地が用いられる。この合成培地には、酵母エキス、ペプトン、コーンステープリカー等の天然栄養物質を含まない化学構造が既知の無機窒素源及び/又は無機物を含有する水溶液が包含される。本発明において用いる合成培地の無機窒素源としては、例えばアンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等を例示することができ、また、無機物としては、例えば、リン酸一水素カリウム、リン酸二水素カリウム、硫酸マグネシウム、硫酸マンガン、硫酸鉄等を例示することができる。これらの無機窒素源および無機塩はそれぞれ、単独でまたは2種以上混合して用いることができる。

【0038】本発明に従うL-イソロイシン又はL-バリンの製造法において用いられる合成培地の一例を示すと次のとおりである： $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2g/l； $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5g/l； $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5g/l； $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5g/l； $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  20ppm； $\text{MnSO}_4 \cdot 4\sim6\text{H}_2\text{O}$  20ppm含有するpH7.6の水溶液。

【0039】本発明のL-イソロイシン又はL-バリン製造法において使用される前記のようにして調製された培養菌体又は菌体処理物の使用量は、特に制限されるものではないが、培地の容量を基準にして一般に1～50% (wt/vol)、好ましくは2～20% (wt/vol)の範囲内の濃度で使用することができる。上記したとおりの組成を有する水性反応液中における培養菌体又は菌体処理物を用いる酵素反応は、一般に約20～約50℃、好ましくは約30～約40℃の温度で通常約10～約72時間行うことができる。

【0040】本発明に従うL-イソロイシンの製造法においては、上記したビオチンを含有しない水性反応液中にて、エタノールと酪酸誘導体と窒素源とが酵素反応せしめられL-イソロイシンが生成される。

【0041】L-イソロイシン製造に際しての、水性反応液中のエタノールの濃度は通常0.5～40容量%、好ましくは1～20容量%の範囲内とすることができる。水性反応液中の酪酸誘導体としては、例えば、DL- $\alpha$ -アミノ酪酸、 $\alpha$ -ケト酪酸又はそれらの塩類を挙げることができる。水性反応液中の酪酸誘導体の濃度は、通常0.1～20% (wt/vol)の濃度範囲で使用するのが適当であるが、特に $\alpha$ -ケト酪酸又はその塩を使用する場合は、反応液中の濃度が常に0.3% (wt/vol)を越えずに添加すると、副生物である



ノルバリンの生成を低減し、L-イソロイシンの収率も向上させることができる。上記した反応基質の添加は、上記濃度を越えないかぎり連続的に行ってもよく、あるいは間欠的に行ってもよい。反応に使用される上記した酪酸誘導体の塩としては、例えば、ナトリウム、カリウム等のアルカリ金属塩類；カルシウム等のアルカリ土類金属塩類；アンモニウム塩等が挙げられ、それらの中でもナトリウム塩が好適である。

【0042】また、本発明に従うL-バリンの製造法においては、上記したピオチンを含むしない水性反応液中にて、グルコースと窒素源とが酵素反応せしめられL-バリンが生成される。L-バリン製造に際しての、水性反応液中のグルコース濃度は、通常0.1～5.0重量%の範囲内とすることができる。グルコースは反応中上記範囲内の濃度に維持されるように連続的または間欠的に水性反応液に添加するのが好ましい。

【0043】かくして製造されるL-イソロイシン又はL-バリンの水性反応液からの分離、精製は、それ自体既知の通常用いられる方法に従って行なうことができ、例えば、イオン交換樹脂処理法、晶析法等の方法を適宜組合せて行うことができる。

【0044】

【実施例】以上に本発明を説明してきたが、下記の実施例によりさらに具体的に説明する。

#### 実施例1

ブレバクテリウム・フラバムMJ-233由来のアセトヒドロキシ酸イソメロダクターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片(A断片)のクローン化

【0045】(A) ブレバクテリウム・フラバムMJ-233の全DNAの抽出

半合成培地A培地〔組成：尿素2g、 $(\text{HN}_4)_2\text{SO}_4$  7g、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5g、 $\text{MgSO}_4$  0.5g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  6mg、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\sim 6\text{H}_2\text{O}$  6mg、酵母エキス2.5g、カザミノ酸5g、ピオチン200 $\mu\text{g}$ 、塩酸チアミン200 $\mu\text{g}$ 、グルコース20g、蒸留水1リットル〕1リットルに、ブレバクテリウム・フラバムMJ-233(FERM BP-1497)を対数増殖期後期まで培養し、菌体を集めた。得られた菌体を10mg/mlの濃度にリゾチームを含む10mM NaCl-20mMトリス緩衝液(pH8.0)-1mM EDTA-2Na溶液15mlに懸濁した。次にプロテナーゼKを、最終濃度が100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように添加し、37℃で1時間保温した。さらにドデシル硫酸ナトリウムを最終濃度が0.5%になるように添加し、50℃で6時間保温して溶菌した。この溶菌液に、等量のフェノール/クロロホルム溶液を添加し、室温で10分間ゆるやかに振盪した後、全量を遠心分離(5,000 $\times$ g、20分間、10～12℃)し、上清画分を分取し、

酢酸ナトリウムを0.3Mとなるように添加した後、2倍量のエタノールをゆっくりと加えた。水層とエタノール層の間に存在するDNAをガラス棒でまきとり、70%エタノールで洗浄した後、風乾した。得られたDNAに10mMトリス緩衝液(pH7.5)-1mM EDTA-2Na溶液5mlを加え、4℃で一晩静置し、以後の実験に用いた。

【0046】(B) 組換え体の創製

上記(A)項で得たブレバクテリウム・フラバムMJ-233の全DNA溶液の90 $\mu\text{l}$ を制限酵素EcoRI及びBglII 50unitsを用い、37℃で1時間反応させ完全分解した。このEcoRI及びBglII分解DNAに平滑末端処理後、クローニングベクターpKK223-3(ファルマシアより市販)を制限酵素EcoRIで切断し平滑末端処理したものを混合し、50mMトリス緩衝液(pH7.6)、10mMジチオスレイトール、1mM ATP、10mM  $\text{MgCl}_2$ 及び $\text{T}_4$  DNAリガーゼ1unitの各成分を添加し(各成分の濃度は最終濃度である)、4℃で15時間反応させ、結合させた。

【0047】(C) アセトヒドロキシ酸イソメロダクターゼをコードする遺伝子を含むプラスミドの選択

上記遺伝子の選択は、前記大腸菌変異株エシェリヒア・コリME8315を用いて行った。上記(B)項で得られたプラスミド混液を用い、塩化カルシウム法(Journal of Molecular Biology, 53, 159, 1970)により前記エシェリヒア・コリME8315を形質転換し、アンピシリン50mgを含む選択培地( $\text{K}_2\text{HPO}_4$  7g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1g、グルコース20g、ロイシン20mg、チアミン1mg及び寒天16gを蒸留水1リットルに溶解)に塗抹した。

【0048】この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを制限酵素により切断し、アガロースゲル電気泳動を用いて調べたところ、プラスミドpKK223-3の長さ4.6kbのDNA断片に加え、長さ約2.1kbの挿入DNA断片が認められた。各種の制限で切断したときの、長さ約2.1kbのDNA断片の制限酵素認識部位数および切断断片の大きさは前記表1に示したとおりであった。このDNA断片の制限酵素切断点地図を図1に示す。

【0049】また上記で得たプラスミドを各種制限酵素で切断して、切断断片の大きさを測定した。その結果を下記の表2に示す。

【0050】

【表2】

表2 プラスミドpKK223-1R

制限酵素	認識部位数	切断片の大きさ (k b)
S a l I	4	4. 0 5 1. 2 0. 9 5 0. 5
P v u I I	2	4. 2 2. 5
E c o R V	1	6. 7

【0051】上記の制限酵素により特徴づけられるプラスミドをpKK223-1Rと命名した。以上によりアセトヒドロキシ酸イソメロダクターゼをコードする遺伝子を含む大きさが約2.1kbのDNA断片(Bgl II-EcoRI断片)を得ることができた。

#### 【0052】実施例2

アセトヒドロキシ酸イソメロダクターゼをコードする遺伝子の塩基配列の決定

実施例1の(D)項で得られたアセトヒドロキシ酸イソメロダクターゼをコードする遺伝子を含む長さ約2.1kbのDNA断片について、その塩基配列をプラスミドpUC118及びpUC119を用いるジデオキシヌクレオチド酵素法(dideoxy chain termination法)(Sahger, F. et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74, 5463, 1977)により図2に示した戦略図に従って決定した。

【0053】その塩基配列中のオープンリーディングフレームの存在から、アセトヒドロキシ酸イソメロダクターゼをコードする遺伝子は、後記配列表の配列番号: 1に示す塩基配列を有する338個のアミノ酸をコードする1014の塩基対より構成されていた。

#### 【0054】実施例3

コリネ型細菌内で複製し安定なプラスミドベクターpCRY30の作成

##### (A) プラスミドpBY503の調製

プラスミドpBY503は、プレビアクテリウム・スタチオニスIFO12144(VERM BP-2515)から分離された分子量約10メガダルトンのプラスミドであり、特開平1-95785号公報に記載のようにして調製した。

【0055】半合成培地A培地[尿素2g、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>7g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>0.5g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>0.5g、MgSO<sub>4</sub>0.5g、FeSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O6mg、MnSO<sub>4</sub>・4~6H<sub>2</sub>O6mg、酵母エキス2.5g、カザミノ酸5g、ピチオン200μg、塩酸チアミン200μg、グルコース20g及び蒸留水1リットル]1リットルに、プレビアクテリウム・スタチオニスIFO12144を対数増殖期後期まで培養し、菌体を集めた。得られた菌体を10mg/mlの濃度にリゾチームを含む緩衝液[25mMトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン、10mMのEDTA、50mMグルコース]20mlに懸濁し、37℃で1時間反応させた。反応液にアルカリ-SDS液[0.2N NaOH、1%(W/V)SDS]40mlを添加し、緩やかに混和して室温にて15分間静置した。次に、こ

の反応液に酢酸カリウム溶液[5M酢酸カリウム溶液60ml、酢酸11.5ml、蒸留水28.5mlの混合液]30mlを添加し、充分混和してから氷水中に15分間静置した。

【0056】溶菌物全量を遠心管に移し、4℃で10分間、15,000×gの遠心分離にかけ、上澄液を得た。これに等量のフェノール-クロロホルム液(フェノール:クロロホルム=1:1混和液)を加え懸濁した後、遠心管に移し、室温下で5分間、15,000×gの遠心分離にかけ、水層を回収した。水層に2倍量のエタノールを加え、-20℃で1時間静置後、4℃で10分間、15,000×gの遠心分離にかけ、沈澱を回収した。

【0057】沈澱を減圧乾燥後、TE緩衝液[トリス10mM、EDTA1mM;HClにてpH8.0に調製]2mlに溶解した。溶解液に塩化セシウム溶液[5倍濃度のTE緩衝液100mlに塩化セシウム170gを溶解させた液]15mlと10mg/mlエチジウムブロマイド溶液1mlを加えて、密度を1.392g/mlに合わせた。この溶液を12℃で42時間、116,000×gの遠心分離を行った。

【0058】プラスミドpBY503は紫外線照射により遠心管内で下方のバンドとして見いだされる。このバンドを注射器で遠心管の側面から抜きとることにより、プラスミドpBY503を含む分画液を得た。次いでこの分画液を等量のイソamilアルコールで4回処理してエチジウムブロマイドを抽出除去し、その後にTE緩衝液に対して透析を行った。このようにして得られたプラスミドpBY503を含む透析液に3M酢酸ナトリウム溶液を最終濃度30mMに添加した後、2倍量エタノールを加え、-20℃1時間静置した。この溶液を15,000×gの遠心分離にかけてDNAを沈降させ、プラスミドpBY503を50μg得た。

#### 【0059】

##### (B) プラスミドベクターpCRY30の作成

プラスミドpHSG298(宝酒造製)0.5μgに制限酵素SalI(5units)を37℃1時間反応させ、プラスミドDNAを完全に分解した。前記(A)項で調製したプラスミドpBY503の2μgに制限酵素XhoI(1unit)を37℃で30分間反応させ、プラスミドDNAを部分分解した。

【0060】両者のプラスミドDNA分解物を混合し、制限酵素を不活性化するために65℃で10分間加熱処理した後、該失活溶液中の成分が最終濃度として各々50mMトリス緩衝液pH7.6、10mM MgCl<sub>2</sub>、10mMジチオスレイトール、1mM ATP及

びT<sub>4</sub> DNAリガーゼ1 unitになるように各成分を強化し、16℃で15時間保温した。この溶液を用いてエシェリヒア・コリJM109コンピテントセル（宝酒造製）を形質転換した。

【0061】形質転換株は30μg/ml（最終濃度）のカナマイシン、100μg/ml（最終濃度）のIPTG（イソプロピルーβ-D-チオガラクトピラノシド）100μg/ml（最終濃度）のX-gal（5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルーβ-D-ガラクトピラノシド）を含むL培地（トリプトン10g、酵母エキス5g、NaCl 5g及び蒸留水1リットル、pH7.2）で37℃にて24時間培養し、生育株として得られた。これらの生育株のうち、白いコロニーで生育してきたものを選択し、各々プラスミドをアルカリ-SDS法〔T. Maniatis, E. F. Fritsch, J. Sambrook, "Molecular cloning" (1982) p90~91参照〕により抽出した。

【0062】その結果、プラスミドpHSG298のSalI部位にプラスミドpBY503由来の約4.0kbの断片が挿入されたプラスミドpHSG298-oriが得られた。次に同様の方法を用い、前記(A)項で得られたプラスミドpBY503DNAを制限酵素KpnI及びEcoRIにて処理して得られる約2.1kbのDNA断片を上記プラスミドpHSG298-oriのKpnI及びEcoRI部位にクローニングし、プラスミドベクターpCRY30を調製した。

#### 【0063】実施例4

プラスミドpCRY-IRの作成及びコリネ型細菌への導入

実施例1の(C)項で得られたプラスミドpKK223-IR 5μgを制限酵素BamHIを5 units用い、37℃で1時間反応させ分解し、平滑末端処理したものと、EcoRIリンカー（宝酒造より市販）1μlを混合し、50mMトリス緩衝液（pH7.6）、10mMジチオスレイトール、1mM ATP、10mM MgCl<sub>2</sub> およびT<sub>4</sub> DNAリガーゼ1 unitの各成分を添加し（各成分の濃度は最終濃度である）、12℃で15時間反応させ結合させた。

【0064】このDNAを制限酵素EcoRI 3 unitsを用い37℃で1時間反応させ分解したものと、実施例3の(B)項で得られたプラスミドpCRY30 1μgを制限酵素EcoRI 1 unitを用い、37℃で1時間反応させ分解したものを混合し、50mMトリス緩衝液（pH7.6）、10mMジチオスレイトール、1mM ATP、10mM MgCl<sub>2</sub> およびT<sub>4</sub> DNAリガーゼ1 unitの各成分を添加し（各成分の濃度は最終濃度である）、12℃で15時間反応させ結合させた。このプラスミドを用いて、前記方法に従い前記エシェリヒア・コリME8315株を形質転換し、カナマイシン50μg/mlを含む選択培地〔K<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub> 7g、KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> 2g、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> 1g、MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.1g、グルコース20g、ロイシン20mg、チアミン1mg及び寒天16gを蒸留水1リットルに溶解〕に塗抹した。

【0065】この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを制限酵素により切断し、アガロースゲル電気泳動を用いて調べたところ、プラスミドpCRY30の長さ8.6kbのDNA断片に加え、大きさ2.4kb〔2.1kb；アセトヒドロキシ酸イソメロダクターゼを含む断片、0.3kb；tacプロモーター（pKK223-3由来）を含む断片〕の挿入DNA断片が認められた。

【0066】上記の如く調製されたプラスミドDNAを、コリネ型細菌へ形質転換した。形質転換は、電気パルス法を用いて次のとおり行った。プレバクテリウム・フラバムMJ-233（FERM BP-1497）プラスミドpBY502除去株を100mlの前記A培地で対数増殖初期まで培養し、ペニシリンGを1ユニット/mlになるように添加して、さらに2時間振盪培養し、遠心分離により菌体を集め、菌体を20mlの puls 用溶液（272mM Sucrose、7mM KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>、1mM MgCl<sub>2</sub>；pH7.4）にて洗浄した。さらに菌体を遠心分離して集め、5mlの puls 用溶液に懸濁し、0.75mlの細胞と、前記で得られたプラスミドDNA溶液50μlとを混合し、水中にて20分間静置した。ジーンパルサー（バイオラ社製）を用いて、2500ボルト、25μFDに設定し、パルスを印加後水中に20分間静置した。全量を3mlの前記A培地に移し30℃にて1時間培養後、カナマイシン15μg/ml（最終濃度）を含む前記A寒天培地に植

菌し30℃で2~3日間培養した。出現したカナマイシン耐性株より、前記実施例3(A)項に記載の方法を用いてプラスミドを得た。このプラスミドを各種制限酵素で切断して、切断断片の大きさを測定した。その結果を下記の表3に示す。

【0067】

【表3】

表3 プラスミドpCRY30-IR

制限酵素	認識部位数	切断片の大きさ (kb)
EcoRI	2	8.6, 2.4
KpnI	1	11.0
BamHI	1	11.0

Sma I	2	6. 2, 4. 8
Sac I	2	8. 4, 2. 6
Xho I	1	11. 0

【0068】上記制限酵素により特徴づけられるプラスミドをpCRY30-IRと命名した。このプラスミドpCRY30-IRの制限酵素切断点地図を図3に示す。なお、プラスミドpCRY30-IRにより形質転換されたプレバクテリウム・フラバムMJ233-IRは、茨城県つくば市東1丁目1番3号の工業技術院生命工学工業技術研究所に、平成5年3月4日付で受託番号：FERM P-13509として寄託されている。

#### 【0069】実施例5

プラスミドpCRY30-IRの安定性

前記のA培地100mlを500ml容三角フラスコに分注し、120℃で15分間滅菌処理したものに、実施例4で得た形質転換株プレバクテリウム・フラバムMJ233-IRを植菌し、30℃にて24時間振盪培養を行った後、同様にして調製したA培地100mlを500ml容三角フラスコに分注し、120℃で15分間滅菌したものに、1ml当たり50cellsの割合になるように植菌し、同じく30℃にて24時間振盪培養を行った。次に遠心分離して集菌し、菌体を洗浄後、カナマイシンを15μg/mlの割合で添加したA培地及び無添加のA培地を用いて調製した平板培地に一定量塗抹し、30℃にて1日培養後生育コロニーをカウントし

た。

【0070】この結果、カナマイシン添加および無添加培地に生育したコロニーは同数であること、さらにA培地生育コロニーは全てカナマイシン添加培地に生育すること、すなわち該プラスミドの高度の安定性を確認した。

#### 【0071】

##### 【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：1017

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源

生物名：プレバクテリウム フラバム

菌株名：MJ233

配列の特徴

特徴を表す記号：peptide

存在位置：1-1017

特徴を決定した方法：E

#### 【0072】

##### 配列

```

ATG GCT ATT GAA CTG CTT TAT GAT GCT GAC GCT GAC CTC TCC TTG ATC 48
Met Ala Ile Glu Leu Leu Tyr Asp Ala Asp Ala Asp Leu Ser Leu Ile
1 5 10 15
CAG GGC CGT AAG GTT GCC ATC GTT GGC TAC GGC TCC CAG GGC CAC GCA 96
Gln Gly Arg Lys Val Ala Ile Val Gly Tyr Gly Ser Gln Gly His Ala
20 25 30
CAC TCC CAG AAC CTC CGC GAT TCT GGC GTT GAG GTT GTC ATT GGT CTG 144
His Ser Gln Asn Leu Arg Asp Ser Gly Val Glu Val Val Ile Gly Leu
35 40 45
CGC GAG GGC TCC AAG TCC GCA GAG AAG GCA AAG GAA GCA GGC TTC GAA 192
Arg Glu Gly Ser Lys Ser Ala Glu Lys Ala Lys Glu Ala Gly Phe Glu
50 55 60
GTC AAG ACC ACC GCT GAG GCT GCA GCT TGG GCT GAC GTC ATC ATG CTC 240
Val Lys Thr Thr Ala Glu Ala Ala Ala Trp Ala Asp Val Ile Met Leu
65 70 75 80
CTG GCT CCA GAC ACC TCC CAG GCA GAA ATC TTC ACC AAC GAC ATC GAG 288
Leu Ala Pro Asp Thr Ser Gln Ala Glu Ile Phe Thr Asn Asp Ile Glu
85 90 95
CCA AAC CTG AAC GCA GGC GAC GCA CTG CTG TTC GGC CAC GGC CTG AAC 336
Pro Asn Leu Asn Ala Gly Asp Ala Leu Leu Phe Gly His Gly Leu Asn
100 105 110
ATT CAC TTC GAC CTG ATC AAG CCA GCT GAC GAC ATC ATC GTT GGC ATG 384
Ile His Phe Asp Leu Ile Lys Pro Ala Asp Asp Ile Ile Val Gly Met
115 120 125

```



GTT GCG CCA AAG GGC OCA GGC CAC TTG GTT CGC CGT CAG TTC GTT GAT 432  
 Val Ala Pro Lys Gly Pro Gly His Leu Val Arg Arg Gln Phe Val Asp  
 130 135 140  
 GGC AAG GGT GTT OCT TGC CTC ATC GCA GTC GAC CAG GAC CCA ACC GGA 480  
 Gly Lys Gly Val Pro Cys Leu Ile Ala Val Asp Gln Asp Pro Thr Gly  
 145 150 155 160  
 ACC GCA CAG GCT CTG ACC CTG TCC TAC GCA GCA GCA ATC GGT GGC GCA 528  
 Thr Ala Gln Ala Leu Thr Leu Ser Tyr Ala Ala Ala Ile Gly Gly Ala  
 165 170 175  
 CGC GCA GGC GTT ATC CCA ACC ACC TTC GAA GCT GAG ACC GTC ACC GAC 576  
 Arg Ala Gly Val Ile Pro Thr Thr Phe Glu Ala Glu Thr Val Thr Asp  
 180 185 190  
 CTC TTC GGC GAG CAG GCT GTT CTC TGC GGT GGC ACC GAG GAA CTG GTC 624  
 Leu Phe Gly Glu Gln Ala Val Leu Cys Gly Gly Thr Glu Glu Leu Val  
 195 200 205  
 AAG GTT GGC TTC GAG GTT CTC ACC GAA GCT GGC TAC GAG CCA GAG ATG 672  
 Lys Val Gly Phe Glu Val Leu Thr Glu Ala Gly Tyr Glu Pro Glu Met  
 210 215 220  
 GCA TAC TTC GAG GTT CTT CAC GAG CTC AAG CTC ATC GTT GAC CTC ATG 720  
 Ala Tyr Phe Glu Val Leu His Glu Leu Lys Leu Ile Val Asp Leu Met  
 225 230 235 240  
 TTC GAA GGT GGC ATC AGC AAC ATG AAC TAC TCT GTT TCT GAC ACC GCT 768  
 Phe Glu Gly Gly Ile Ser Asn Met Asn Tyr Ser Val Ser Asp Thr Ala  
 245 250 255  
 GAG TTC GGT GGC TAC CTC TCC GGC CCA CGC GTC ATC GAT GCA GAC ACC 816  
 Glu Phe Gly Gly Tyr Leu Ser Gly Pro Arg Val Ile Asp Ala Asp Thr  
 260 265 270  
 AAG TCC CGC ATG AAG GAC ATC CTG ACC GAT ATC CAG GAC GGC ACC TTC 864  
 Lys Ser Arg Met Lys Asp Ile Leu Thr Asp Ile Gln Asp Gly Thr Phe  
 275 280 285  
 ACC AAG CGC CTC ATC GCA AAC GTT GAG AAC GGC AAC ACC GAG CTT GAG 912  
 Thr Lys Arg Leu Ile Ala Asn Val Glu Asn Gly Asn Thr Glu Leu Glu  
 290 295 300  
 GGT CTT CGT GCT TCC TAC AAC AAC CAC CCA ATC GAG GAG ACC GGC GCT 960  
 Gly Leu Arg Ala Ser Tyr Asn Asn His Pro Ile Glu Glu Thr Gly Ala  
 305 310 315 320  
 AAG CTC CGC GAC CTC ATG AGC TGG GTC AAG GTT GAC GCT CGC GCA GAA 1008  
 Lys Leu Arg Asp Leu Met Ser Trp Val Lys Val Asp Ala Arg Ala Glu  
 325 330 335  
 ACC GCT TAA 1017  
 Thr Ala

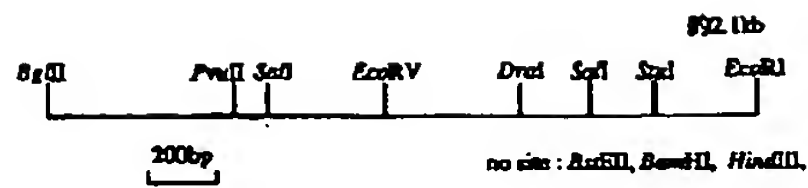
【図面の簡単な説明】

【図1】本発明のアセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼをコードする遺伝子を含む大きさが約2.1 kbのDNA断片の制限酵素切断点地図。

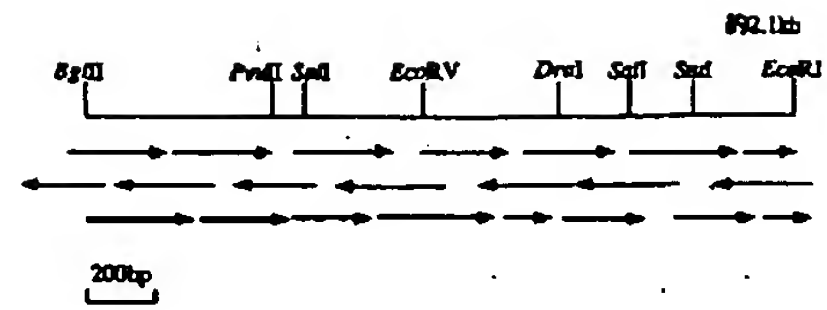
【図2】大きさが約2.1 kbの本発明のDNA断片の塩基配列決定のための戦略図。

【図3】本発明のプラスミドpCRY30-IRの制限酵素切断点地図。

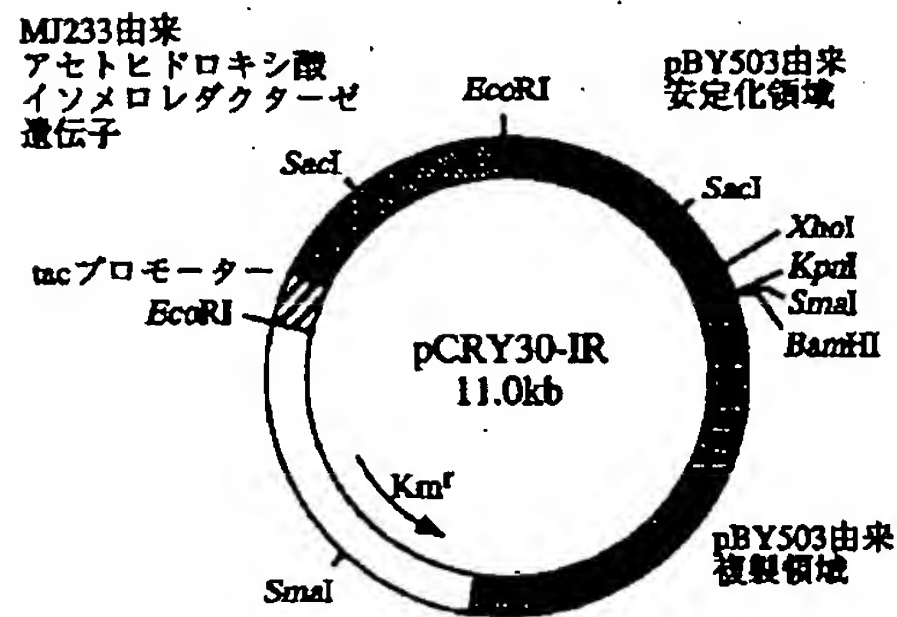
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>5</sup> 識別記号 庁内整理番号 F. I

技術表示箇所

C 1 2 R 1:13)  
(C 1 2 N 1/21  
C 1 2 R 1:13)